

* NOTICES *

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

1. How to be approach to which high-density lipoprotein (HDL) cholesterol is made to increase in Homo sapiens who shows blood serum HDL of low level, and include process which prescribes for the patient constituent which contains immunogenicity epitope and carrier of cholesterol ester transition protein (CETP) in this Homo sapiens.
2. Approach according to claim 1 said immunogenicity epitope is CETP refined substantially.
3. Approach according to claim 1 said immunogenicity epitope is peptide.
4. Approach according to claim 1 said immunogenicity epitope contains B cell epitope.
5. Said Peptide is H-Cys-Asp-Ala-Gly-Ser-Val-Arg-Thr-Asn-Ala-Pro-Asp-OH (Array Number 2);; H-Cys-Asp-Ser-Gly-Arg-Val-Arg-Thr-Asp-Ala-Pro-Asp-OH(array number 1); and H-His-Leu-Leu-Val-Asp-Phe-Leu-Gln-Ser-Leu-Ser-OH (array number 3)
since -- the approach according to claim 3 chosen from the becoming group.
6. Approach according to claim 1 chosen from group which said carrier becomes from KLH, ovalbumin, diphtheria toxoid, and tetanus toxoid.
7. Approach according to claim 1 by which said constituent is prescribed for the patient with adjuvant.
8. Approach according to claim 1 by which said administration is repeated.
9. How to be approach of decreasing danger of atherosclerosis in Homo sapiens who shows blood serum high-density lipoprotein (HDL) of low level, and include process which prescribes for the patient constituent which contains immunogenicity epitope and carrier of cholesterol ester transition protein (CETP) in this Homo sapiens.
10. The approach according to claim 9 said immunogenicity epitope is CETP refined substantially.
11. The approach according to claim 9 said immunogenicity epitope is a peptide.
12. The approach according to claim 9 said immunogenicity epitope contains a B cell epitope.
13. Said Peptide is H-Cys-Asp-Ala-Gly-Ser-Val-Arg-Thr-Asn-Ala-Pro-Asp-OH (Array Number 2);; H-Cys-Asp-Ser-Gly-Arg-Val-Arg-Thr-Asp-Ala-Pro-Asp-OH(array number 1); and H-His-Leu-Leu-Val-Asp-Phe-Leu-Gln-Ser-Leu-Ser-OH (array number 3)
since -- the approach according to claim 11 chosen from the becoming group.
14. The approach according to claim 9 chosen from the group which said carrier becomes from KLH, an ovalbumin, diphtheria toxoid, and tetanus toxoid.
15. The approach according to claim 9 by which said constituent is prescribed for the patient with an adjuvant.
16. The approach according to claim 9 by which said administration is repeated.
17. The approach according to claim 9 said atherosclerosis is atherosclerosis cardiopathy.

[Translation done.]

peptide") of CETP or CETP which has the epitope which can stimulate such a response. A peptide may be combination-ized by keyhole limpet hemocyanin (KLH) or carrier like an ovalbumin in order to increase immunogenicity (conjugated). An adjuvant may also be prescribed for the patient.

In the one embodiment, the fragmentation of CEPT used in order to cause an antibody response is the die length of about 10 to 20 amino acid, and has the array of a rabbit or Homo sapiens CETP, and a homologous array.

Easy explanation of a drawing Drawing 1 shows the anti-CETP peptide potency of an immunity term throughout about the animal by which immunity was carried out with either the toxoid combination-ized peptide (continuous line), the isolation peptide (broken line) or the physiological saline (dotted line). An error bar shows standard deviation.

Drawing 2 shows the CETP activity of an immunity term throughout about the animal by which immunity was carried out with either the toxoid combination-ized peptide (continuous line), the isolation peptide (broken line) or the physiological saline (dotted line). An error bar shows standard deviation.

Drawing 3 shows CETP activity as a function of the time amount after giving cholesterol foods to the animal which carried out immunity. Immunity of the animal was carried out with either the toxoid combination-ized peptide (continuous line) or the isolation peptide (broken line). An error bar shows standard deviation.

Drawing 4 shows HDL cholesterol level as a function of the time amount after giving cholesterol foods to the animal which carried out immunity. About an animal, it is a toxoid combination-ized peptide (continuous line).

Or immunity was carried out with either of the isolation peptides (broken line). An error bar shows standard deviation.

Drawing 5 shows LDL cholesterol level as a function of the time amount after giving cholesterol foods to the animal which carried out immunity. About an animal, it is a toxoid combination-ized peptide (continuous line).

Or immunity was carried out with either of the isolation peptides (broken line). An error bar shows standard deviation.

Drawing 6 shows LDL / HDL cholesterol ratio as a function of the time amount after giving cholesterol foods to the animal which carried out immunity. About an animal, it is a toxoid combination-ized peptide (continuous line).

Or immunity was carried out with either of the isolation peptides (broken line). An error bar shows standard deviation.

Detailed description This invention offers the approach of using the own immune system of the body in order to reduce CETP level, and thereby, it increases useful HDL cholesterol level. This invention provides a detail with the effective method of raising HDL in a blood serum more among blood. Since HDL level is increased, by using the own immune system of the body, this invention avoids the problem relevant to repeat administration of drugs which has the side effect which is not desirable.

According to this invention, a suitable individual is medicated with a CETP peptide in a format which induces an anti-CETP immune response. A CETP peptide may be chosen so that it may have the epitope which can stimulate an antibody or a humoral response. Or a CETP peptide can stimulate a cellularity response or other immune responses. A CETP peptide may be chosen so that it may have a B cell epitope, and the array can stimulate production of the antibody which recognizes the epitope specifically and is combined. Or the CETP peptide which stimulates a T cell or a more general immune response may be chosen.

Especially the individual with the danger which the low blood serum level of HDL cholesterol is shown, or shows is suitable for such a therapy. Blood serum HDL level may be measured using the well-known approach in the field concerned (for example, refer to Warnick and G.R.J.Lipid.Res. which are used as reference into this description, and 19:65 (1978).). It is thought that blood serums HDL fewer than about 30 to 35 mg/dl are low. Especially the analyte that shows the blood serum HDL level which is less than this level is suitable for the treatment of this invention.

The protein or the peptide which should be prescribed for the patient may be the whole CETP protein or a part, as long as the protein or peptide has a B cell and/or a T cell epitope. It is meant that a "CETP peptide" includes both the CETP amino acid sequence of an overall length and its fragmentation so that it may be used in this description. A peptide corresponds to a mammals CETP array, or may have the array which is homologous. A peptide may differ from a natural array to some extent, as long as the antibody which checks CETP activity can be guided.

Although CETP is protein of 55 kD based on the amino acid sequence, it has the molecular weight of the appearance of 66-74 kD by qualification after a translation. The Homo sapiens CETP mRNA array is available at Genbank (deposition number M30185). The rabbit CETP mRNA array is available at Genbank (deposition number M27486). A Genbank array is a MacVector software program (I. B.M), in order to acquire Homo sapiens and the perfect amino acid sequence of Rabbit CETP.

It translated using New Haven and Connecticut.

Since it may be recognized as a "self" antigen, and a carrier increases those immunogenicity, CETP and its peptide derivative may be used. Such a carrier is common knowledge in the field concerned, for example, such a compound includes keyhole limpet hemocyanin (KLH), an ovalbumin, diphtheria toxoid (Wako BioProducts), and tetanus toxoid (Connaught). A CETP peptide may be combination-ized with such a carrier by the well-known approach in the field concerned. Current Protocols in Molecular Biology, Ausebell, Brent, Kingston, Moore, Seidman, and Smith It reaches. Refer to Strull editing (1987) or a manufacturer's directions for use. This is used as reference into this description. The immunogenicity of a peptide may also increase by administration of an adjuvant. Various adjuvants are common knowledge and available. Refer to the volume (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow, and on Lane. This is used as reference into this description.

It may act as the monitor of extent of the anti-CETP response guided by administration of a CETP peptide using various assays. For example, immunoassay of a contention format (competitive format) may be carried out using an anti-CETP antibody or anti-CETP antiserum. Or it may act as the monitor of the activity level of CETP of an analyte individual for example, using ^3H -cholesterol oleate transition assay. Lausuncion, M.A. et al., Biochem J., 270:441-449 (1990). Reduction of CETP activity is the direct index of an anti-CETP response.

It does not mean that the following examples illustrate and limit this invention.

Example 1 Administration of CETP peptide immunogen The peptide corresponding to the parts of Homo sapiens, a rabbit and a rabbit / Homo sapiens CETP was prepared according to the standard peptide synthesis protocol. : which prepared the following peptide arrays -- H-Cys-Asp-Ser-Gly-Arg-Val-Arg-Thr-Asp-Ala-Pro-Asp-OH (array number 1)

H-Cys-Asp-Ala-Gly-Ser-Val-Arg-Thr-Asn-Ala-Pro-Asp-OH (array number 2)

H-His-Leu-Leu-Val-Asp-Phe-Leu-Gln-Ser-Leu-Ser-OH (array number 3).

The 1st peptide (array number 1) is obtained from Smith used as reference into this description and Barakat, Med.Sci.Res., and the Homo sapiens CETP peptide array (131 -142 residue which does not contain transit peptide) from 21:911-912 (1993). The 2nd peptide (array number 2) is a corresponding rabbit array, and only 3 amino acid differs from Homo sapiens.

The 3rd peptide (array number 3) is an epitope which is common to both Homo sapiens and a rabbit, and is recognized by the anti-CETP monoclonal antibody which is counteraction.

Tall, A.R., J.Lipids Res., 34:1255-1257 (1993).

The peptide was combination-ized to the ovalbumin by the approach of above-mentioned Current Protocols in Molecular Biology. The intramuscular injection of the 100-microgram ovalbumin combination-ized Homo sapiens peptide (array number 1) and CFA in PBS was carried out to two in New Zealand SHIROUSAGI (about four-month age) of four animals, and they were injected with equivalent Homo sapiens / rabbit peptide (array number 3) at two animals. The booster was carried out twice to these animals with the same peptide in Freund's incomplete adjuvant (IFA) at intervals of one month.

Example 2 Immunity in toxoid combination-ized CETP Immunity of the three groups (3 per group) of the New Zealand rabbit of Metz was carried out with either the toxoid combination-ized peptide, the

isolation peptide or the physiological saline. Immunity was once prescribed for the patient every seven weeks about a total of 4 times of immunity throughout [immunity term]. The back of each animal was medicated with each immunity by ten places and intradermal injection. Each immunogen was emulsified to IFA and the emulsion of 100microper animal g or 1ml was given to each part of each animal for every immunity.

The peptide used for a toxoid combination-ized peptide and an isolation peptide is :H-His-Leu-Leu-Val-Asp-Phe-Leu-Gln-Ser-Leu-Ser-OH (array number 3) which was the same.

. The peptide of a toxoid combination-ized peptide was combination-ized with either diphtheria toxoid or tetanus toxoid. The animal of a toxoid combination-ized peptide group was medicated with both toxoid combination-ized peptides. The diphtheria toxoid combination-ized peptide and the tetanus toxoid combination-ized peptide were prescribed for the patient for alternative immunity, in order to avoid carrier induction immunosuppression (for example, refer to Gaur, A. and Int.Immunol. which are used as reference into this description, and 2:151 (1990)).

A usual diet was given to all animals before the period of immunity, during a period, and after eight weeks. The animal of a toxoid combination-ized peptide and an isolation peptide group was changed, and the diet which contains cholesterol 1% was made to ** and remember it after [of the last immunity] eight weeks (remined on). Food and water were made to take in freely during an experiment except 14 hours before a blood sampling of all animals.

The anti-CETP peptide potency was measured by ELISA assay. The peptide combination-ized by KLH was simply covered on the microtiter plate, it incubated with the blood serum which diluted the plate, and the united antibody was detected by the goat-alpha-USAGI HRP antibody. It was shown as a counterpart (reciprocal) of the dilution which gives 50% of the maximum response by the anti-CETP peptide potency.

The significant anti-CETP peptide potency (103 is exceeded) was produced in the toxoid combination-ized peptide group of an immunity term throughout. On the contrary, the animal of an isolation peptide group and a physiological saline group did not produce a significant anti-CETP peptide potency. The CETP peptide potency from which throughout [immunity term] was obtained is summarized to drawing 1.

CETP activity was measured until it ended the experiment before the first immunity (blood collecting forward period). CETP activity was measured by isolating HDL of the Homo sapiens blood serum origin, and the 3H-cholesterol oleate which carried out the indicator using a well-known approach (for example, refer to Lasuncion, M.A. and Biochem.J. which are used as reference into this description, and 270:441 (1990)). 3 H-HDL (3000 cpm) was incubated at 37 degrees C for 1 hour with 2.5microl sample blood serum in the total capacity 1 of 50micro of VLDL and 50 mM Tris, 150 mM NaCl, and 2 mM EDTA (pH 7.4). It stopped using the Homo sapiens blood serum of 450microl, and the reaction was settled by the tungstophosphoric acid and MgCl₂. Counting of supernatant liquid and the re-suspended precipitation was carried out with the scintillation counter, and the result was shown as a ratio of the CETP activity which is the percent of the 3H-cholesterol ester which was standardized to average percent transition of a physiological saline group, and to which it transferred.

A significant reduction of CETP activity was found out about the animal of a toxoid combination-ized group.

The CETP activity of an immunity term throughout is summarized to drawing 2 .

The purification antibody of the animal origin of a toxoid combination-ized peptide group checked CETP activity to 42%. When compared, the purification antibody of the animal origin of a physiological saline group checked CETP activity only less than 2%. Monoclonal antibody TP-2 by which reacting with CETP is known checked CETP activity to 52% (for example, refer to Whitlock, M.E., J.Clin.Invest., and 84:129 (1989)). Therefore, the antibody to CETP produced by the animal of a toxoid combination-ized peptide group brings about reduction of the CETP activity produced in the group. The antibody was refined from the blood serum using the well-known HPLC high capacity protein A column-chromatography method.

Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, and triglyceride level were measured through the

blood collecting forward period, period-of-immunity, and immunity back. LDL cholesterol was evaluated according to Friedwald and a Ley and Fredrickson equation (refer to Friedwald, W.T. and Clin Chem. which are used as reference into this description, and 18:499 (1972)).

While giving a usual diet to during a blood collecting forward period and an animal, the significant difference was not detected in the cholesterol or triglyceride level in a group. The total cholesterol, the HDL cholesterol, LDL cholesterol, and triglyceride level in the period of these are summarized to a table 1.

表1：各免疫期間のウサギにおける血清コレステロールおよびトリグリセリドレベルの比較

免疫	期間	総	HDL	LDL	総
		コレステロール (mg/dL)*	コレステロール (mg/dL)*	コレステロール (mg/dL)*	トリグリセリド (mg/dL)*
-生理食塩水	0 (採血前)	52.8 ± 8.0	22.9 ± 2.1	21.3 ± 6.0	43.0 ± 3.3
	1 (0-6週)	53.9 ± 8.6	28.1 ± 3.3	17.6 ± 7.6	35.9 ± 0.8
	2 (7-14週)	54.7 ± 5.0	30.9 ± 2.7	16.2 ± 2.9	41.3 ± 2.6
	3 (15-21週)	40.9 ± 6.6	25.3 ± 4.2	7.7 ± 3.0	39.4 ± 1.1
	4 (22-28週)	40.5 ± 3.5	25.4 ± 3.4	7.9 ± 1.0	36.2 ± 4.1
遊離ペプチド	0 (採血前)	46.2 ± 0.9	20.2 ± 1.9	16.3 ± 4.1	48.5 ± 9.2
	1 (0-6週)	46.3 ± 0.5	25.3 ± 1.7	13.3 ± 2.8	38.9 ± 9.3
	2 (7-14週)	53.7 ± 6.4	29.3 ± 1.1	12.6 ± 6.3	49.2 ± 10.0
	3 (15-21週)	39.7 ± 3.7	24.6 ± 1.3	6.5 ± 5.3	43.3 ± 16.6
	4 (22-28週)	38.5 ± 3.5	23.8 ± 1.4	6.3 ± 4.4	42.3 ± 15.0
結合体化ペプチド	0 (採血前)	57.8 ± 28.0	23.7 ± 11.2	24.1 ± 13.8	50.3 ± 14.9
	1 (0-6週)	56.9 ± 15.8	30.9 ± 11.3	18.1 ± 7.7	46.2 ± 4.3
	2 (7-14週)	44.0 ± 15.0	26.7 ± 8.6	10.3 ± 4.5	34.9 ± 9.6
	3 (15-21週)	44.0 ± 12.5	27.0 ± 6.5	10.4 ± 2.5	33.2 ± 11.1
	4 (22-28週)	48.0 ± 10.4	28.0 ± 6.5	12.5 ± 4.6	38.0 ± 9.9

* Each value shows the average ** standard deviation to six blood collecting (blood collecting forward period) or seven blood collecting about a consecutiveness period.

When an animal was switched to cholesterol foods 1%, total cholesterol, LDL cholesterol, and CETP activity increased intentionally in both animals of a toxoid combination-ized peptide group and an isolation peptide group as compared with the animal of general diet. The total cholesterol of the back before cholesterol foods, HDL cholesterol, LDL cholesterol, the total triglyceride, a HDL-triglyceride, CETP activity, and an anti-CETP peptide potency are summarized to a table 2.

表2：コレステロール食の前および後の、トキソイド結合体化ペプチドおよび遊離ペプチドで免疫されたウサギにおける血清学的マーカーの比較

群	コレステロール [*]	コレステロール [*] (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	総 (mg/dL)	トリグリセリド (mg/dL)	トリグリセリド (mg/dL)	HDL (mg/dL)	CETP 活性比	CETP 活性	抗CETP 抗体価
Free peptide	-	39.8 ± 5.7	24.7 ± 4.0	5.5 ± 5.0	48.3 ± 15.0	20.5 ± 3.4	0.91 ± 0.07	1.76 ± 1			
	+	1810.5 ± 195.7	23.0 ± 2.6	1770.8 ± 189.5	83.9 ± 24.9	17.5 ± 4.5	1.15 ± 0.08	1.78 ± 4			
Conjugated peptide	-	48.0 ± 10.4	28.0 ± 6.5	12.5 ± 4.6	37.9 ± 9.9	17.6 ± 3.6	0.79 ± 0.09†	1.13860 ± 6274			
	+	1115.9 ± 140.0	34.9 ± 2.1†	1437.3 ± 333.2	85.6 ± 41.2	17.6 ± 2.1	0.93 ± 0.08§	1.5919 ± 626			

* 各測定値は、コレステロール食の直前 8 週間 (21-28 週) (-)、およびコレステロール食を与えた後の 5 週間 (29-32 週) (+) の平均値標準偏差である。差は、組になつた Student t テストによって決定した。

† p = 0.021, n = 3

‡ p = 0.003, n = 3

§ p = 0.013, n = 3

The CETP activity about the animal of cholesterol foods was intentionally low about the toxoid combination-sized peptide group as compared with the animal of an isolation peptide group. Such CETP

activity of an animal is summarized to drawing 3 as a function of the time amount of cholesterol foods. The HDL cholesterol level about the animal of cholesterol foods was intentionally high about the toxoid combination-ized peptide group as compared with the isolation peptide group. Such HDL cholesterol level of an animal is summarized to drawing 4 as a function of the time amount of cholesterol foods. The LDL cholesterol level about the animal of cholesterol foods did not have a significant difference about a toxoid combination-ized peptide group as compared with the isolation peptide group. Such LDL cholesterol level of an animal is summarized to drawing 5 as a function of the time amount of cholesterol foods.

LDL / HDL cholesterol level ratio about the animal of cholesterol foods were intentionally high about the isolation peptide group as compared with the toxoid combination-ized peptide group. As a function of the time amount of cholesterol foods, LDL / HDL cholesterol level ratio of such an animal are summarized to drawing 5.

The animal which carried out immunity of this result with the toxoid combination-ized peptide shows that HDL cholesterol level is gone up in the animal which took in cholesterol foods.

Low HDL cholesterol level relates to buildup of the danger of atherosclerosis regardless of LDL cholesterol level. Therefore, the immunity over CETP can decrease the danger of atherosclerosis by going up HDL cholesterol level.

Although this invention referred to the desirable embodiment and has been indicated in this description, it should be understood that various alterations may be carried out without deviating from the pneuma of this invention. Therefore, this invention is limited by only the following claims.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

[Drawing 1]

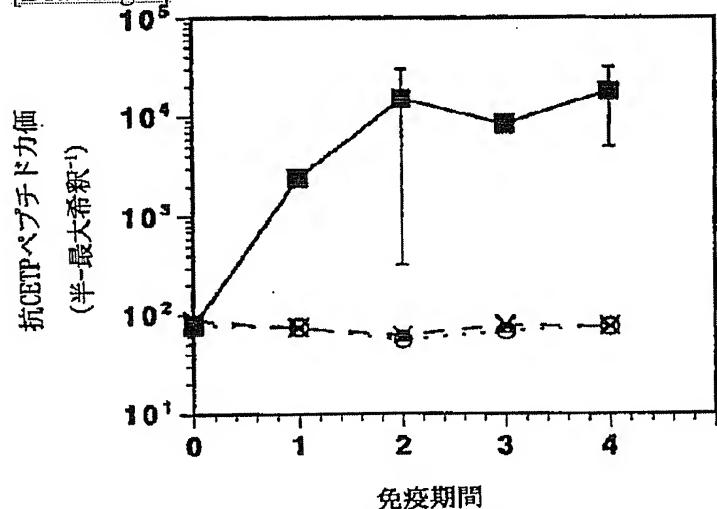


FIG. 1

[Drawing 2]

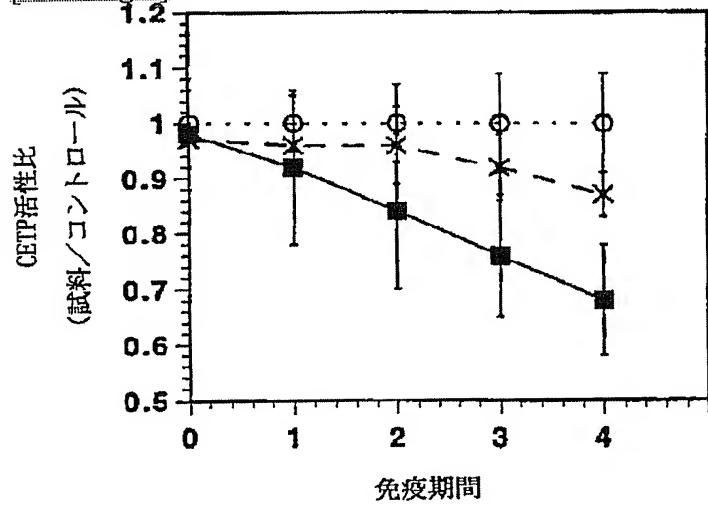


FIG. 2

[Drawing 3]

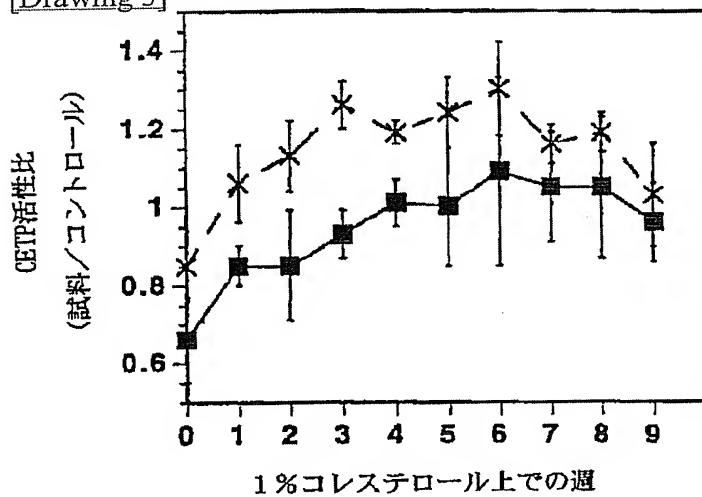


FIG. 3

[Drawing 4]

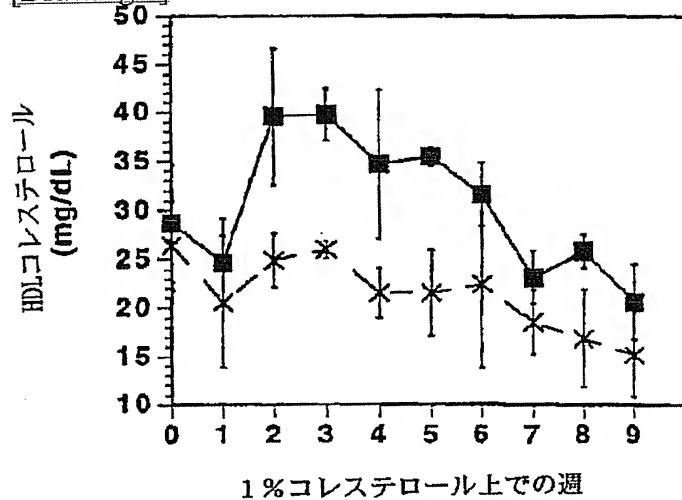


FIG. 4

[Drawing 5]

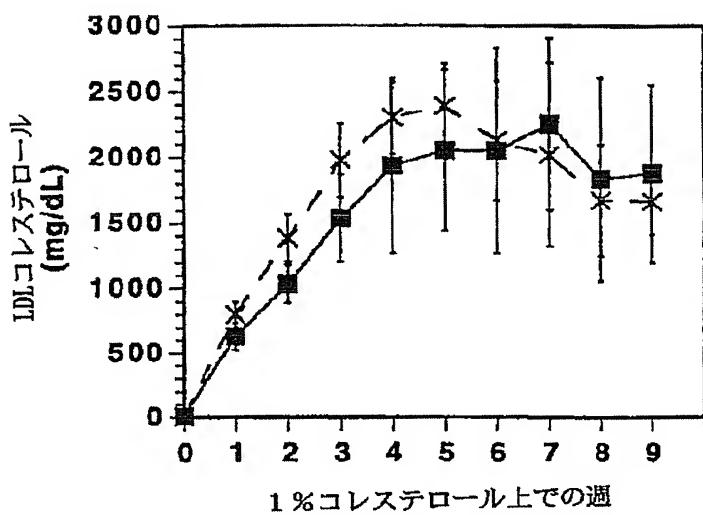


FIG. 5

[Drawing 6]

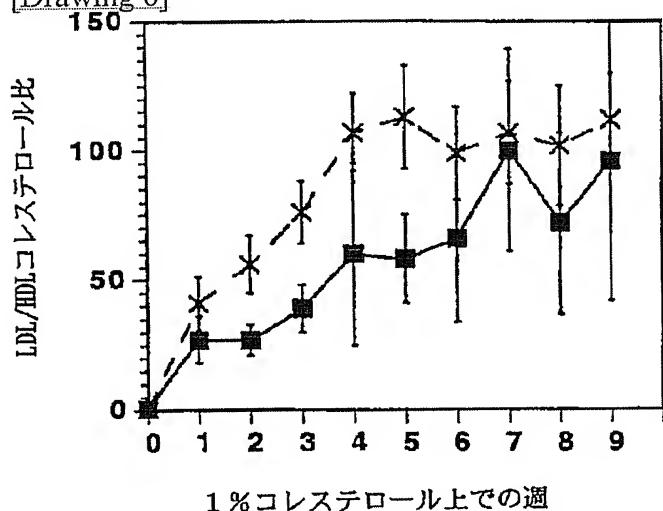


FIG. 6

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-507910

(43)公表日 平成11年(1999)7月13日

(51)IntCl.⁶
A 61 K 38/00

識別記号
ADN
ABN

F I
A 61 K 37/22
37/02

ADN
ABN

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁)

(21)出願番号 特願平9-501533
(86) (22)出願日 平成8年(1996)6月5日
(85)翻訳文提出日 平成9年(1997)12月5日
(86)国際出願番号 PCT/US96/09143
(87)国際公開番号 WO96/39168
(87)国際公開日 平成8年(1996)12月12日
(31)優先権主張番号 08/482,454
(32)優先日 1995年6月6日
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ザ イミューン レスpons コーポレーション
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92008,
カールスバッド, ダーウィン コート
5935
(72)発明者 クー, デボラ ワイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92009,
カールスバッド, ジャカランダ アベニュー
1-2404
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 HDLコレステロールレベルを増大する方法

(57)【要約】

本発明は、CETPの機能を阻害する免疫応答を刺激することによって、哺乳動物におけるHDLコレステロールを増加させる方法を提供する。このような免疫応答は、このような応答を刺激し得るエピトープを含有するCETPまたはCETPのフラグメント(まとめて「CETPペプチド」と呼ぶ)で免疫することにより誘導され得る。ペプチドは、免疫原性を増大するために、KLHまたはオボアルブミンのようなキャリアに結合体化され得る。アジュバントがまた投与され得る。

【特許請求の範囲】

1. 低いレベルの血清HDLを示すヒトにおいて、高密度リポタンパク質 (HDL) コレステロールを増加させる方法であって、該ヒトに、コレステロールエステル転移タンパク質 (CETP) の免疫原性エピトープおよびキャリアを含有する組成物を投与する工程を包含する、方法。
2. 前記免疫原性エピトープが実質的に精製されたCETPである、請求項1に記載の方法。
3. 前記免疫原性エピトープがペプチドである、請求項1に記載の方法。
4. 前記免疫原性エピトープがB細胞エピトープを含有する、請求項1に記載の方法。
5. 前記ペプチドが、

H-Cys-Asp-Ala-Gly-Ser-Val-Arg-Thr-Asn-Ala-Pro-Asp-OH

(配列番号2) ;

H-Cys-Asp-Ser-Gly-Arg-Val-Arg-Thr-Asp-Ala-Pro-Asp-OH

(配列番号1) ; および

H-His-Leu-Leu-Val-Asp-Phe-Leu-Gln-Ser-Leu-Ser-OH

(配列番号3)

からなる群より選択される、請求項3に記載の方法。

6. 前記キャリアが、KLH、オボアルブミン、ジフテリアトキソイド、および破傷風トキソイドからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

7. 前記組成物がアジュバントとともに投与される、請求項1に記載の方法。

8. 前記投与が繰り返される、請求項1に記載の方法。

9. 低いレベルの血清高密度リポタンパク質 (HDL) を示すヒトにおいて、アテローム性動脈硬化症の危険性を減少する方法であって、該ヒトに、コレステロールエステル転移タンパク質 (CETP) の免疫原性エピトープおよびキャリアを含有する組成物を投与する工程を包含する、方法。

10. 前記免疫原性エピトープが実質的に精製されたCETPである、請求項9に記載の方法。

- 1 1. 前記免疫原性エピトープがペプチドである、請求項9に記載の方法。
- 1 2. 前記免疫原性エピトープがB細胞エピトープを含有する、請求項9に記載の方法。
- 1 3. 前記ペプチドが、

H-Cys-Asp-Ala-Gly-Ser-Val-Arg-Thr-Asn-Ala-Pro-Asp-OH

(配列番号2) ;

H-Cys-Asp-Ser-Gly-Arg-Val-Arg-Thr-Asp-Ala-Pro-Asp-OH

(配列番号1) ; および

H-His-Leu-Leu-Val-Asp-Phe-Leu-Gln-Ser-Leu-Ser-OH

(配列番号3)

からなる群より選択される、請求項1 1に記載の方法。

1 4. 前記キャリアが、KLH、オボアルブミン、ジフテリアトキソイド、および破傷風トキソイドからなる群より選択される、請求項9に記載の方法。

1 5. 前記組成物がアジュバントとともに投与される、請求項9に記載の方法。

1 6. 前記投与が繰り返される、請求項9に記載の方法。

1 7. 前記アテローム性動脈硬化症がアテローム性動脈硬化心臓疾患である、請求項9に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

HDLコレステロールレベルを増大する方法

本発明は、一般に、免疫治療分野に関し、より詳細には、コレステロールエステル転移タンパク質 (CETP) に対する免疫応答を刺激する方法に関する。

発明の背景

血液コレステロールレベルは、アテローム性動脈硬化心臓疾患の危険性に直接に関連し、心臓発作を導くと長く考えられてきた。より最近に、血液コレステロールが、実際に、2つの一次的な形態から構成されることが認められた：高密度リポタンパク質 (HDL) および低密度リポタンパク質 (LDL)。疾患の危険性に関連するのではなく、高いHDLレベルは明かに逆の徵候である。実際、今日の研究は、HDLがアテローム性動脈硬化症に対する防御において直接の作用を有し、アテローム性動脈硬化症斑の症状の緩解さえも促進し得ることが示された。

多数の因子が、身体でのコレステロールレベル調節に関与する。コレステロールエステル転移タンパク質 (CETP) は、HDLから非常に低い密度のリポタンパク質 (VLDL) およびLDLへのコレステロールエステル (CE) の運搬に応答し得る酵素である。VLDLは最終的にLDLに変換される。CETPは、プロ-と抗-アテローム原性 (anti-atherogenic) リポタンパク質画分との間で脂質成分の変換を特異的に加速する。特に、血漿中のCETPレベルとHDLコレステロールレベルとの間で強い逆の相関関係 (inverse correlation) が存在する。CETP活性レベルは、食事性または遺伝性高コレステロール血症を罹患した個体において上昇される。CETP活性の増大したレベルは、HDLのより低いレベルをもたらす。逆に、CETP遺伝子中の変異に起因するCETP活性の不全を伴う個体は、著しく上昇されたHDLレベルを有する。

より高等な生物の免疫系は、ウイルス、細菌、および寄生虫のような有害な外来物質による侵襲に対して、個体を防御する手段として開発された。免疫系の細胞は、個体自身の身体から（「自己」物質と呼ばれる）と、外来物質または抗原

とを区別し得る。外来物質が身体に侵入すると、免疫系は応答を増す。外来物質を特異的に認識して結合する抗体が產生される（抗体または体液性応答）。さら

に、T細胞は、外来物質に抵抗するために動員される（T細胞または細胞性応答）。自己として認識される物質は、特定病理学的条件下（原発性自己免疫疾患）以外は、通常はこのような応答を刺激しない。内因性タンパク質の存在が、それ自身有害であるときできえ、免疫系は、その物質が自己として認識されれば、リギュレーターとして作用し得ない。

アテローム性動脈硬化症の予防におけるHDLの潜在的に有用な効果のために、血清中のそのレベルを増大するために使用され得る方法の必要性が存在する。このような方法は、理想的に特異的かつ確実であり、そして可能な限り身体の侵襲がないべきである。本発明は、この必要性を満たし、かつ関連する利点をも提供する。

発明の要旨

本発明は、CETPの機能を阻害する免疫応答を刺激することによって、哺乳動物でHDLコレステロールを増加する方法を提供する。このような免疫応答は、このような応答を刺激し得るエピトープを有する、CETPまたはCETPのフラグメント（まとめて、「CETPペプチド」と呼ぶ）で免疫することによって誘導され得る。ペプチドは、免疫原性を増大させるために、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）またはオボアルブミンのようなキャリアに結合体化（conjugated）され得る。アジュバントもまた投与され得る。

1つの実施態様では、抗体応答を惹起するために使用されるCETPのフラグメントは、約10から20アミノ酸の長さであり、そしてウサギまたはヒトCETPの配列と相同的な配列を有する。

図面の簡単な説明

図1は、トキソイド結合体化ペプチド（実線）、遊離ペプチド（破線）、または生理食塩水（点線）のいずれかで免疫された動物についての、免疫期間中の抗CETPペプチド力価を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

図2は、トキソイド結合体化ペプチド（実線）、遊離ペプチド（破線）、または生理食塩水（点線）のいずれかで免疫された動物についての、免疫期間中のCETP活性を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

図3は、免疫した動物にコレステロール食を与えた後の時間の関数として、CETP活性を示す。動物を、トキソイド結合体化ペプチド（実線）あるいは遊離ペプチド（破線）のいずれかで免疫した。エラーバーは標準偏差を示す。

図4は、免疫した動物にコレステロール食を与えた後の時間の関数として、HDL-コレステロールレベルを示す。動物を、トキソイド結合体化ペプチド（実線）あるいは遊離ペプチド（破線）のいずれかで免疫した。エラーバーは標準偏差を示す。

図5は、免疫した動物にコレステロール食を与えた後の時間の関数として、LDL-コレステロールレベルを示す。動物を、トキソイド結合体化ペプチド（実線）あるいは遊離ペプチド（破線）のいずれかで免疫した。エラーバーは標準偏差を示す。

図6は、免疫した動物にコレステロール食を与えた後の時間の関数として、LDL/HDL-コレステロール比を示す。動物を、トキソイド結合体化ペプチド（実線）あるいは遊離ペプチド（破線）のいずれかで免疫した。エラーバーは標準偏差を示す。

発明の詳細な説明

本発明は、CETPレベルを低下させるために身体自身の免疫系を利用する方法を提供し、それにより、有用なHDLコレステロールレベルを増大させる。本発明は、血液中、より詳細には血清中のHDLを上昇させる有効な方法を提供する。HDLレベルを増大するために身体自身の免疫系を利用することによって、本発明は、望ましくない副作用を有する、薬剤の繰り返し投与に関連する問題を回避する。

本発明に従って、CETPペプチドを、抗CETP免疫応答を誘発するような様式で、適切な個体に投与する。CETPペプチドは、抗体または体液性応答を刺激し得るエピトープを有するように選択され得る。あるいは、CETPペプチドは、細胞性応答、またはその他の免疫応答を刺激し得る。CETPペプチドは、B細胞エピトープを有

するように選択され得、その配列はそのエピトープを特異的に認識して結合する抗体の産生を刺激し得る。あるいは、T細胞またはより一般的な免疫応答を刺激

する、CETPペプチドが選択され得る。

HDLコレステロールの低い血清レベルを示すか、または示す危険性のある個体は、このような治療に特に適切である。血清HDLレベルは、当該分野で周知の方法を用いて測定され得る（例えば、本明細書中に参考として援用される、Warnick, G. R. J. Lipid. Res., 19:65(1978)を参照のこと。）。約30-35 mg/dlより少ない血清HDLは、低いと考えられる。このレベルを下回る血清HDLレベルを示す被検体は、本発明の処置に特に適している。

投与されるべきタンパク質またはペプチドは、そのタンパク質またはペプチドがB細胞および/またはT細胞エピトープを有する限り、CETPタンパク質の全体または部分であり得る。本明細書中で使用されるように、「CETPペプチド」は、全長のCETPアミノ酸配列およびそのフラグメントの両方を包含することが意図される。ペプチドは、哺乳類CETP配列に対応するか、または相同である配列を有し得る。ペプチドは、CETP活性を阻害する抗体を誘導し得る限り、ある程度天然配列と異なり得る。

CETPは、そのアミノ酸配列に基づく55 kDのタンパク質であるが、翻訳後の修飾によって、66-74 kDの見かけの分子量を有する。ヒトCETP mRNA配列は、Genbank（寄託番号 M30185）で入手可能である。ウサギCETP mRNA配列は、Genbank（寄託番号 M27486）で入手可能である。Genbank配列は、ヒトおよびウサギCETPの完全なアミノ酸配列を得るために、MacVectorソフトウェアプログラム（I. B. M. New Haven, Connecticut）を用いて翻訳された。

CETPおよびそのペプチド誘導体は、「自己」抗原として認識され得るので、キャリアが、それらの免疫原性を増大するために使用され得る。このようなキャリアは、当該分野で周知であり、例えば、このような化合物は、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、オボアルブミン、ジフテリアトキソイド（Wako BioProducts）、および破傷風トキソイド（Connaught）を包含する。CETPペプチドは、当該分野で周知の方法によって、このようなキャリアと結合体化され得る。Current Protocols in Molecular Biology、Ausbell, Brent, Kingston, Moore, Se

idman, Smith および Strull 編 (1987)、または、製造者の使用説明書を参照のこと。これは、本明細書中に参考として援用される。ペプチドの免疫原性もまた、アジュバントの投与によって増大され得る。種々のアジュバントが周知であり、入手可能である。Antibodies: A Laboratory Manual、Harlow および Lane 編 (1988) を参照のこと。これは本明細書中に参考として援用される。

CETPペプチドの投与によって誘導される抗CETP応答の程度は、種々のアッセイを用いてモニターされ得る。例えば、競合形式 (competitive format) のイムノアッセイが、抗CETP抗体または抗CETP抗血清を使用して実施され得る。あるいは、被検体個体のCETPの活性レベルは、例えば、³H-コレステロールオレイン酸エステル転移アッセイを用いてモニターされ得る。Lausuncion, M. A. ら、Biochem J., 270:441-449 (1990)。CETP活性の減少は、抗CETP応答の直接の指標である。

以下の実施例は、本発明を例示し、限定することを意図しない。

実施例 1

CETPペプチド免疫原の投与

ヒト、ウサギ、およびウサギ/ヒトCETPの部分に対応するペプチドを、標準的なペプチド合成プロトコールに従って調製した。以下のペプチド配列を調製した：

H-Cys-Asp-Ser-Gly-Arg-Val-Arg-Thr-Asp-Ala-Pro-Asp-OH

(配列番号1)

H-Cys-Asp-Ala-Gly-Ser-Val-Arg-Thr-Asn-Ala-Pro-Asp-OH

(配列番号2)

H-His-Leu-Leu-Val-Asp-Phe-Leu-Gln-Ser-Leu-Ser-OH

(配列番号3)。

第1のペプチド (配列番号1) は、本明細書中に参考として援用されるSmithおよびBarakat, Med. Sci. Res., 21:911-912 (1993) からのヒトCETPペプチド配列 (シグナルペプチドを含まない131-142残基) から得る。第2のペプチド (配列番号2) は、対応するウサギ配列であり、そしてヒトとは3アミノ酸のみ異なる。

第3のペプチド (配列番号3) は、ヒトおよびウサギの両方に共通し、そして

中和性である抗CETPモノクローナル抗体によって認識されるエピトープである。

Tall, A. R., J. Lipids Res., 34:1255-1257 (1993)。

ペプチドは、前出のCurrent Protocols in Molecular Biologyの方法によって、オボアルブミンに結合体化した。四匹のニュージーランドシロウサギ（約四ヶ月齢）のうち二匹に、PBS中の100マイクログラムオボアルブミン結合体化ヒトペプチド（配列番号1）およびCFAを筋肉内注射し、そして二匹に、等量のヒト／ウサギペプチド（配列番号3）を注射した。これらの動物に、一ヶ月間隔で2回、フロイントの不完全アジュバント（IFA）中の同じペプチドで追加免疫した。

実施例2

トキソイド結合体化CETPでの免疫

メスのニュージーランドウサギの3つの群（群あたり3匹）を、トキソイド結合体化ペプチド、遊離ペプチド、または生理食塩水のいずれかで免疫した。免疫は、免疫期間中合計4回の免疫について、7週間毎に一度投与した。各免疫は、各動物の背中に10カ所、皮内注射によって投与した。各免疫原をIFAに乳化し、各動物の各々の部位に、免疫ごとに、動物あたり100 μ gのエマルジョンまたは1mlを与えた。

トキソイド結合体化ペプチドおよび遊離ペプチドに使用されるペプチドは同じであった：H-His-Leu-Leu-Val-Asp-Phe-Leu-Gln-Ser-Leu-Ser-OH（配列番号3）。トキソイド結合体化ペプチドのペプチドを、ジフテリアトキソイドまたは破傷風トキソイドのいずれかと結合体化した。両方のトキソイド結合体化ペプチドを、トキソイド結合体化ペプチド群の動物に投与した。ジフテリアトキソイド結合体化ペプチドおよび破傷風トキソイド結合体化ペプチドを、キャリア誘導免疫抑制を避けるために代替免疫で投与した（例えば、本明細書中に参考として援用されるGaur, A., Int. Immunol., 2:151 (1990)を参照のこと）。

免疫期間の前、期間中、および8週間後に、全動物に通常の食餌を与えた。最後の免疫の8週間後に、トキソイド結合体化ペプチドおよび遊離ペプチド群の動物を、1%コレステロールを含有する食餌に切り替え、そし思い出させた（reminded on）。全ての動物を、血液サンプリングの前の14時間以外は、実験中、食物お

より水を自由に摂取させた。

抗CETPペプチド力価を、ELISAアッセイによって測定した。簡単には、KLHに結合体化されたペプチドを、マイクロタイタープレートに被覆し、そのプレートを希釈した血清とともにインキュベートし、そして結合した抗体をヤギ- α -ウサギ-³HRP抗体で検出した。抗CETPペプチド力価を、最大応答の50%を与える希釈物の相対物 (reciprocal) として示した。

有意な抗CETPペプチド力価 (10^3 を超える) が、免疫期間中のトキソイド結合体化ペプチド群において生産された。逆に、遊離ペプチド群および生理食塩水群の動物は、有意な抗CETPペプチド力価を生産しなかった。免疫期間中の得られた CETPペプチド力価は、図1に要約する。

CETP活性を、最初の免疫の前 (採血前期間) および実験を終了するまで測定した。CETP活性は、公知の方法を用いてヒト血清由来のHDLおよび標識した ³H-コレステロールオレイン酸エステルを単離することにより測定した (例えば、本明細書中に参考として援用される、Lasuncion, M. A., Biochem. J., 270:441 (1990) を参照のこと)。³H-HDL (3000 cpm) を、VLDLおよび50 mM Tris、150 mM NaCl、2 mM EDTA (pH 7.4) の総容量50 μ l 中の2.5 μ l 試料血清とともに、37°Cで1時間インキュベートした。反応を、450 μ l のヒト血清を用いて停止し、そしてリンタングステン酸およびMgCl₂によって沈殿させた。上清および再懸濁した沈殿をシンチレーションカウンターで計数し、そして結果を、生理食塩水群の平均パーセント転移に対して標準化した、転移された ³H-コレステロールエステルのパーセントである、CETP活性の比として示した。

CETP活性の有意な減少が、トキソイド結合体化群の動物について見出された。免疫期間中のCETP活性を、図2に要約する。

トキソイド結合体化ペプチド群の動物由来の精製抗体は、CETP活性を42%まで阻害した。比較すると、生理食塩水群の動物由来の精製抗体は、CETP活性を2%未満しか阻害しなかった。CETPと反応することが知られているモノクローナル抗体 TP-2は、CETP活性を52%まで阻害した (例えば、Whitlock, M. E., J. Clin. Invest., 84:129 (1989) を参照のこと)。従って、トキソイド結合体化ペプチド群の動物によって產生されたCETPに対する抗体は、その群において生じるCETP活性の

減少をもたらす。抗体は、周知のHPLC高容量プロテインAカラムクロマトグラフィー法を用いて血清から精製された。

総コレステロール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、およびトリグリセリドレベルを、採血前期間、免疫期間、および免疫後を通じて測定した。LDLコレステロールを、Friedwald, Ley and Fredrickson方程式に従って、評価した（本明細書中に参考として援用される、Friedwald, W. T., Clin Chem., 18:499 (1972) を参照のこと）。

採血前期間の間および動物に通常の食餌を与えた間は、群中のコレステロールまたはトリグリセリドレベルにおいて有意な差は検出されなかつた。これらの期間中の総コレステロール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、およびトリグリセリドレベルを、表1に要約する。

表1：各免疫期間のウサギにおける血清コレステロールおよびトリグリセリドレベルの比較

免疫	期間	総	HDL	LDL	総
		コレステロール (mg/dL)*	コレステロール (mg/dL)*	コレステロール (mg/dL)*	トリグリセリド (mg/dL)*
-生理食塩水	0 (採血前)	52.8 ± 8.0	22.9 ± 2.1	21.3 ± 6.0	43.0 ± 3.3
	1 (0-6週)	53.9 ± 8.6	28.1 ± 3.3	17.6 ± 7.6	35.9 ± 0.8
	2 (7-14週)	54.7 ± 5.0	30.9 ± 2.7	16.2 ± 2.9	41.3 ± 2.6
	3 (15-21週)	40.9 ± 6.6	25.3 ± 4.2	7.7 ± 3.0	39.4 ± 1.1
	4 (22-28週)	40.5 ± 3.5	25.4 ± 3.4	7.9 ± 1.0	36.2 ± 4.1
遊離ペプチド	0 (採血前)	46.2 ± 0.9	20.2 ± 1.9	16.3 ± 4.1	48.5 ± 9.2
	1 (0-6週)	46.3 ± 0.5	25.3 ± 1.7	13.3 ± 2.8	38.9 ± 9.3
	2 (7-14週)	53.7 ± 6.4	29.3 ± 1.1	12.6 ± 6.3	49.2 ± 10.0
	3 (15-21週)	39.7 ± 3.7	24.6 ± 1.3	6.5 ± 5.3	43.3 ± 16.6
	4 (22-28週)	38.5 ± 3.5	23.8 ± 1.4	6.3 ± 4.4	42.3 ± 15.0
結合体化ペプチド	0 (採血前)	57.8 ± 28.0	23.7 ± 11.2	24.1 ± 13.8	50.3 ± 14.9
	1 (0-6週)	56.9 ± 15.8	30.9 ± 11.3	18.1 ± 7.7	46.2 ± 4.3
	2 (7-14週)	44.0 ± 15.0	26.7 ± 8.6	10.3 ± 4.5	34.9 ± 9.6
	3 (15-21週)	44.0 ± 12.5	27.0 ± 8.5	10.4 ± 2.5	33.2 ± 11.1
	4 (22-28週)	48.0 ± 10.4	28.0 ± 6.5	12.5 ± 4.6	38.0 ± 9.9

*各値は、6回の採血（採血前期間）または後続期間についての7回の採血に対する平均値±標準偏差を示す。

動物を、1%コレステロール食に切り換えたときに、総コレステロール、LDL-コ

コレステロール、およびCETP活性は、普通食の動物に比較して、トキソイド結合体化ペプチド群および遊離ペプチド群の動物の両方において有意に増加した。コレステロール食の前および後の、総コレステロール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、総トリグリセリド、HDL-トリグリセリド、CETP活性、および抗CETPペプチド力値を、表2に要約する。

表2：コレステロール食の前および後の、トキソイド結合体化ペプチドおよび遊離ペプチドで免疫されたウサギにおける血清学的マーカーの比較

群	コレステロール [*]		コレステロール [*]		コレステロール [*]		コレステロール [*]		コレステロール [*]	
	コレステロール [*]	(mg/dL)	コレステロール [*]	(mg/dL)	コレステロール [*]	(mg/dL)	コレステロール [*]	(mg/dL)	コレステロール [*]	(mg/dL)
Free peptide	-	39.8 ± 5.7	24.7 ± 4.0	5.5 ± 5.0	46.3 ± 15.0	20.5 ± 3.4	0.91 ± 0.07	1.76 ± 1	抗CETP CETP抗体活性	
	+	1810.5 ± 195.7	23.0 ± 2.6	1770.8 ± 189.5	83.9 ± 24.9	17.5 ± 4.5	1.15 ± 0.08	1.78 ± 4	抗CETP CETP抗体活性	
Conjugated peptide	-	43.0 ± 10.4	28.0 ± 6.5	12.5 ± 4.6	37.9 ± 9.9	17.6 ± 3.6	0.70 ± 0.09†	1:13800 ± 6274		
	+	1115.9 ± 140.0	34.9 ± 2.1†	1437.3 ± 333.2	85.6 ± 41.2	17.6 ± 2.1	0.93 ± 0.08§	1:5339 ± 620		

*各測定値は、コレステロール食の直前8週間(21-28週) (-)、および1%コレステロールを与えた後の5週間(29-32週) (+)の平均値±標準偏差である。差は、組になったstudent tテストによって決定した。

† p=0.021, n=3

‡ p=0.003, n=3

§ p=0.013, n=3

コレステロール食の動物についてのCETP活性は、遊離ペプチド群の動物に比較して、トキソイド結合体化ペプチド群について有意に低かった。このような動物のCETP活性を、コレステロール食の時間の関数として、図3に要約する。

コレステロール食の動物についてのHDL-コレステロールレベルは、遊離ペプチド群に比較して、トキソイド結合体化ペプチド群について有意に高かった。このような動物のHDL-コレステロールレベルを、コレステロール食の時間の関数として、図4に要約する。

コレステロール食の動物についてのLDL-コレステロールレベルは、遊離ペプチド群に比較して、トキソイド結合体化ペプチド群について有意差がなかった。このような動物のLDL-コレステロールレベルを、コレステロール食の時間の関数として、図5に要約する。

コレステロール食の動物についてのLDL/HDL-コレステロールレベル比は、トキソイド結合体化ペプチド群に比較して、遊離ペプチド群について有意に高かった。このような動物のLDL/HDL-コレステロールレベル比をコレステロール食の時間の関数として、図5に要約する。

この結果は、トキソイド結合体化ペプチドで免疫した動物は、コレステロール食を摂取した動物において、HDL-コレステロールレベルを上昇することを示す。低HDL-コレステロールレベルは、LDL-コレステロールレベルに関係なく、アテローム性動脈硬化症の危険性の増大に関連する。従って、CETPに対する免疫は、HDL-コレステロールレベルを上昇することによって、アテローム性動脈硬化症の危険性を減少し得る。

本発明は、本明細書中で好ましい実施態様を参考にして記載されてきたが、種々の改変が、本発明の精神から逸脱することなく実施され得ることが理解されるべきである。従って、本発明は、以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。

【図1】

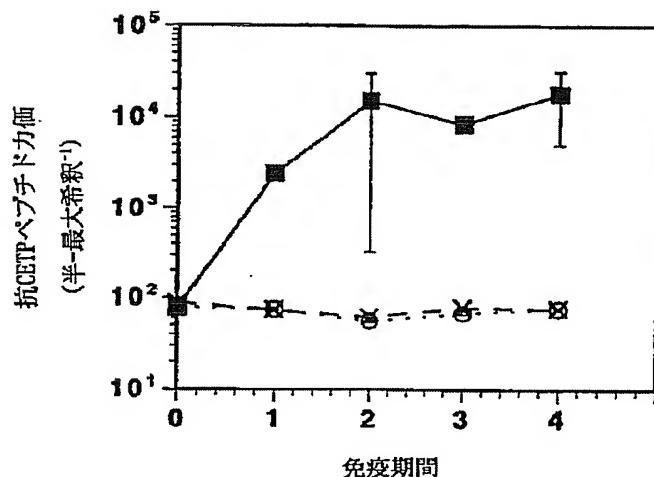


FIG. 1

【図2】

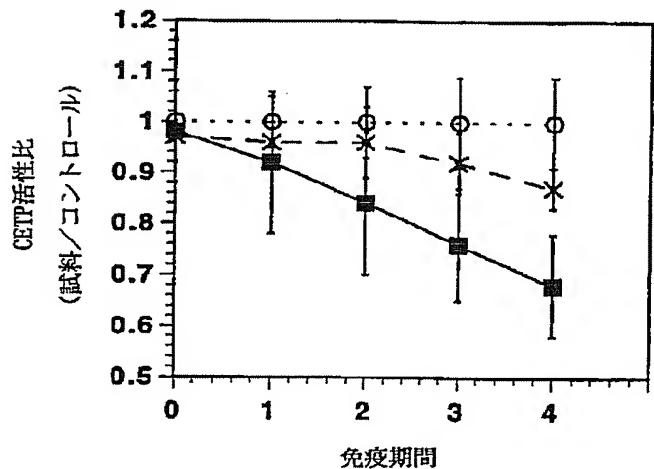


FIG. 2

【図3】

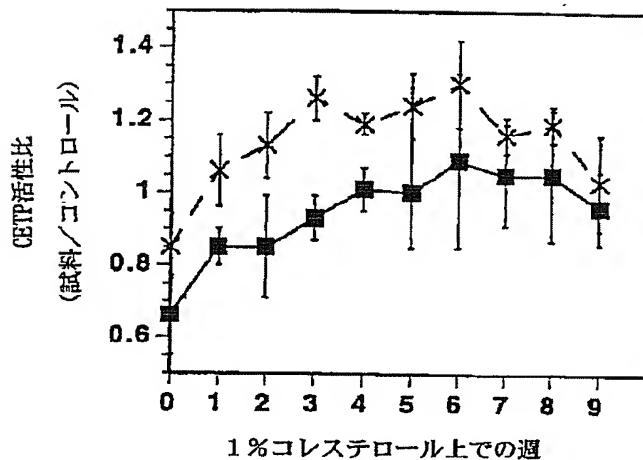


FIG. 3

【図4】

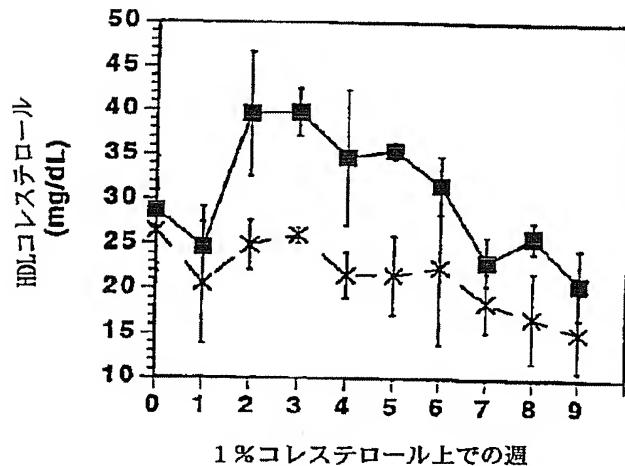


FIG. 4

【図5】

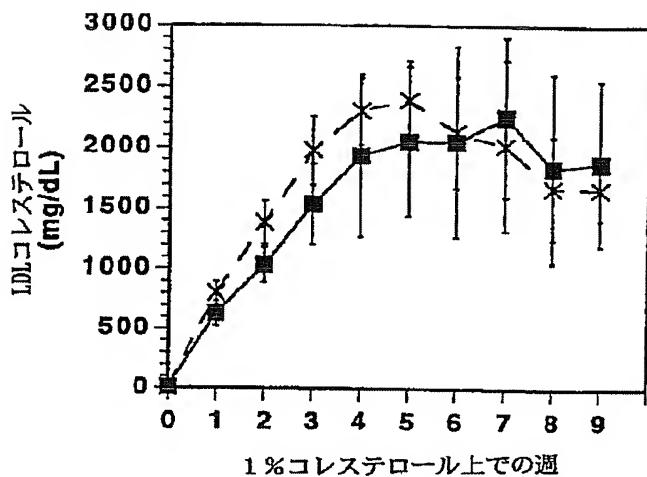


FIG. 5

【図6】

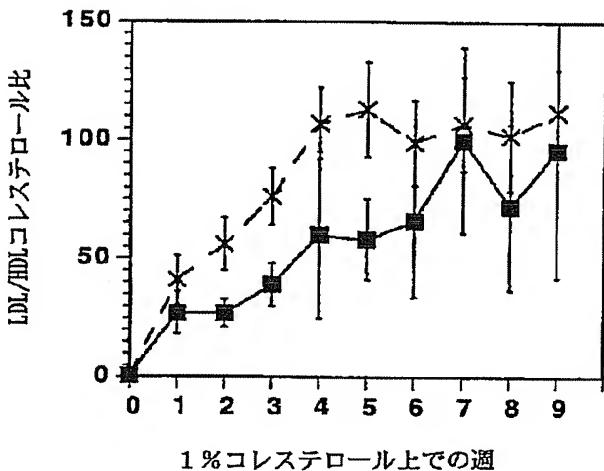


FIG. 6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 96/09143						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K38/17								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K A61K								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;"> DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABSTRACT 95105666, EVANS ET AL: "INHIBITION OF CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN IN NORMOCHOLESTEROLEMIC AND HYPERCHOLESTEROLEMIC HAMSTERS: EFFECTS ON HDL SUBSPECIES, QUANTITY, AND APOLIPOPROTEIN DISTRIBUTION" XP002014308 & JOURNAL OF LIPID RESEARCH, (1994 SEP) 35(9) 1634-45 see abstract --- -/-/ </td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-9</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABSTRACT 95105666, EVANS ET AL: "INHIBITION OF CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN IN NORMOCHOLESTEROLEMIC AND HYPERCHOLESTEROLEMIC HAMSTERS: EFFECTS ON HDL SUBSPECIES, QUANTITY, AND APOLIPOPROTEIN DISTRIBUTION" XP002014308 & JOURNAL OF LIPID RESEARCH, (1994 SEP) 35(9) 1634-45 see abstract --- -/-/	1-9
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABSTRACT 95105666, EVANS ET AL: "INHIBITION OF CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN IN NORMOCHOLESTEROLEMIC AND HYPERCHOLESTEROLEMIC HAMSTERS: EFFECTS ON HDL SUBSPECIES, QUANTITY, AND APOLIPOPROTEIN DISTRIBUTION" XP002014308 & JOURNAL OF LIPID RESEARCH, (1994 SEP) 35(9) 1634-45 see abstract --- -/-/	1-9						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.								
* Special categories of cited documents : * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance * "E" earlier document but published on or after the international filing date * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed								
* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art * "&" document member of the same patent family								
Date of the actual completion of the international search 25 September 1996	Date of mailing of the international search report 14.10.96							
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentzaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Sitch, W							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 96/09143
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 24, 25 August 1989, pages 14318-14326, XP000575971 SWENSON T L ET AL: "MECHANISM OF CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN INHIBITION BY A NEUTRALIZING MONOCLONAL ANTIBODY AND MAPPING OF THE MONOCLONAL ANTIBODY EPITOPE" see page 14318, abstract and paragraphs 1-3 ---	1-9
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 267, no. 25, 5 September 1992, pages 17487-17490, XP000575972 WANG S ET AL: "IDENTIFICATION OF A SEQUENCE WITHIN THE C-TERMINAL 26 AMINO ACIDS OF CHOLESTERYL ESTER TRANSFER PROTEIN RESPONSIBLE FOR BINDING A NEUTRALIZING MONOCLONAL ANTIBODY AND NECESSARY FOR NEUTRAL LIPID TRANSFER ACTIVITY" see page 17487, abstract ---	1-9
A	WO,A,93 11782 (SOUTHWEST FOUND BIOMED RES) 24 June 1993 ---	
A	WO,A,95 04755 (SOUTHWEST FOUND BIOMED RES) 16 February 1995 -----	

<p style="text-align: center;">INTERNATIONAL SEARCH REPORT</p>	<p>International application No. PCT/US96/09143</p>
<p>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</p>	
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p>	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Remark: Although claims 1 - 9 are directed to a method of treatment of the human/animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
<p>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</p>	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p>	
<p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p>	
<p>Remark on Protest</p>	
<p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p>	
<p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat'l Application No
PCT/US 96/09143

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9311782	24-06-93	EP-A-	0618803	12-10-94
		US-A-	5512548	30-04-96
		US-A-	5519001	21-05-96
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9504755	16-02-95	AU-A-	7552694	28-02-95
		CA-A-	2145767	16-02-95
		EP-A-	0664813	02-08-95
		JP-T-	8502525	19-03-96
		US-A-	5519001	21-05-96
-----	-----	-----	-----	-----

フロントページの続き

(81)指定国 E P (AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L
U, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF
, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE,
SN, TD, TG), AP (KE, LS, MW, SD, S
Z, UG), UA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD
, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ
, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, I
L, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK
, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, R
U, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR
, TT, UA, UG, UZ, VN

(72)発明者 ブロストフ, スティーブン ダブリュー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92009,
カールスバッド, ブラック スワン プレ
イス 7323

(72)発明者 カルロ, デニス ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92067,
ランチョサンタフェ, ピー. オー. ボッ
クス 1176